

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10084997 A**

(43) Date of publication of application: **07 . 04 . 98**

(51) Int. Cl

C12Q 1/60
G01N 33/92

(21) Application number: **09215785**

(22) Date of filing: **25 . 07 . 97**

(30) Priority: **25 . 07 . 96 JP 08214347**

(71) Applicant: **WAKO PURE CHEM IND LTD**

(72) Inventor: **MIKI YUTAKA**
IMASHIYOU NOBUKO
HANADA TOSHIRO

(54) ASSAY OF LDL-CHOLESTEROL

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To easily assay the subject compound useful as an index for the diagnosis, treatment, etc., of arteriosclerosis, ischemic cardiopathy, etc., by carrying out the determination in the presence of an amphoteric surfactant and an aliphatic amine having carboxyl group or sulfonic acid group.

SOLUTION: A biospecimen is mixed with a 1st reagent liquid containing an aqueous medium, the absorbancy OD_1 of the mixture is measured, the mixture is mixed with a 2nd reagent liquid containing cholesterol oxidase and cholesterol esterase, the absorbancy OD_2 is

measured after the completion of the reaction and a value obtained by multiplying OD_1 by a correction factor is subtracted from OD_2 to obtain absorbancy OD_3 . The content of cholesterol in low-density lipoprotein in the biospecimen is assayed from the obtained OD_3 using a calibration curve of the cholesterol amount and OD_3 prepared by a method similar to the above using standard solutions containing cholesterol of known concentrations. The above process is carried out without necessitating complicate pretreatment by adding an amphoteric surfactant and an aliphatic amine having carboxyl group or sulfonic acid group to at least one of the 1st reagent and the 2nd reagent.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-84997

(43)公開日 平成10年(1998)4月7日

(51)Int.Cl.
C 12 Q 1/60
G 01 N 33/92

識別記号

F I
C 12 Q 1/60
G 01 N 33/92

A

審査請求 未請求 請求項の数12 FD (全 17 頁)

(21)出願番号 特願平9-215785
(22)出願日 平成9年(1997)7月25日
(31)優先権主張番号 特願平8-214347
(32)優先日 平8(1996)7月25日
(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000252300
和光純薬工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(72)発明者 三木 豊
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工
業株式会社大阪研究所内
(72)発明者 今莊 展子
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工
業株式会社大阪研究所内
(72)発明者 花田 寿郎
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工
業株式会社大阪研究所内

(54)【発明の名称】 LDL-コレステロールの測定法

(57)【要約】

【課題】 低比重リポタンパク (LDL) 中のコレステ
ロールを、従来法に於いて必要であった、LDLとLD
L以外の不要のリポタンパクとを分離するための煩雑な
前処理操作なしに直接自動分析装置等を用いて測定し得
る方法及びそれに用いられる試薬を提供。

【解決手段】 両性界面活性剤及び、カルボキシル基又
はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の存在下で行う
ことを特徴とする、LDL中のコレステロールの測定
法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 両性界面活性剤及び、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の存在下で測定を行うことを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロールの測定法。

【請求項2】 生体試料と、水性媒体を含んでなる第一試液とを混合した後に吸光度 (OD_1) を測定し、次いで該混合液と、コレステロールオキシダーゼ及びコレステロールエステラーゼを含んでなる第二試液とを混合して反応させた後に吸光度 (OD_2) を測定し、 OD_2 から、 OD_1 に補正係数を掛けて得られた値を差し引いた吸光度 (OD_3) を求め、得られた OD_3 を、予め既知濃度のコレステロールを含む標準品を用いて上記と同様にして求めた、コレステロール量と OD_3 との関係を示す検量線に当てはめることにより生体試料中の低比重リポタンパク中のコレステロールを求める特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロールの測定法であって、両性界面活性剤とカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類が夫々第一試液と第二試液の少なくとも一方に含まれ、また、カップラー、デベロッパー、及びペルオキシダーゼが夫々第一試液と第二試液の少なくとも一方に含まれていることを特徴とする、該測定法。

【請求項3】 カップラーとデベロッパーの一方が第一試液に含まれ、他方が第二試液に含まれている、請求項2に記載の測定法。

【請求項4】 両性界面活性剤が第一試液に含まれている、請求項2に記載の測定法。

【請求項5】 両性界面活性剤が、ベタイン誘導体、アミノカルボン酸誘導体、イミダゾリン誘導体及びアミノオキサイド誘導体からなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物である、請求項1又は2に記載の測定法。

【請求項6】 カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類が、アミノ酸類、アミノエタンスルホン酸誘導体、アミノプロパンスルホン酸誘導体及びグリシン誘導体からなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物である、請求項1又は2に記載の測定法。

【請求項7】 非イオン性界面活性剤非共存下で実施する、請求項1又は2に記載の測定法。

【請求項8】 両性界面活性剤及び、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類を含んでなる、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬。

【請求項9】 更に、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼ及び被酸化性呈色試薬を含む、請求項8に記載の試薬。

【請求項10】 被酸化性呈色試薬が、カップラー及びデベロッパーからなる、請求項9に記載の試薬。

【請求項11】 カップラー（又はデベロッパー）を含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼと、デベ

ロッパー（又はカップラー）を含んでなる第二試薬とを含んでなるものであって、両性界面活性剤とカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類が夫々第一試薬と第二試薬の少なくとも一方に含まれている、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用キット。

【請求項12】 両性界面活性剤と、カップラー（又はデベロッパー）を含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオ

キシダーゼと、デベロッパー（又はカップラー）を含んでなる第二試薬とを含んでなるものであって、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類が第一試薬と第二試薬の少なくとも一方に含まれている、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用キット。

【0001】

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】 本発明は、血清、血漿などの生体試料中に存在する低比重リポタンパク（以下、LDLと略記する。）中のコレステロールの測定法及びそのための試薬に関する。

【0002】

【発明の背景】 血清中の脂質の主な成分はコレステロール、トリグリセライド、リン脂質等であり、これら血清脂質はアポタンパクと結合してリポタンパクを形成し血中を循環する。該リポタンパクは比重の差により高比重リポタンパク（HDL）、LDL、超低比重リポタンパク（VLDL）カイロミクロン（CM）等に分類される。これらリポタンパクのうち、HDLは組織に沈着した過剰なコレステロールを肝臓へ運搬する作用があり、抗動脈硬化作用を有し、一方、LDLは肝臓から各組織へのコレステロールの主たる運搬体であり、LDLの増加は動脈硬化発生と密接な関係があると考えられている。従って、LDL中のコレステロール（以下、LDL—コレステロールと略記する。）は、動脈硬化症、虚血性心疾患（冠動脈疾患）の危険因子と考えられ、該LDL—コレステロールの含有量は、これら疾患の診断・治療および予防の重要な指標となる。

【0003】 従来、LDL—コレステロールの測定法としては、沈殿法、超遠心法、電気泳動法、算出式による算出法等が知られている。これら従来法のうち、沈殿法、超遠心法及び電気泳動法は、沈殿・遠心分離処理、超遠心分離処理或いは電気泳動処理により、LDLとLDL以外の不要のリポタンパクとを分離する前処理工程が必要であるため、操作が煩雑であり、現在、臨床検査の分野で広く普及している自動分析装置だけで直接測定を実施することができないという問題点を有している。また、フローデワルド（Friedewald）の式で知られている総コレステロール値、HDL—コレステロール値及びトリグリセライド値から算出する算出法も、トリグリセライドが500mg/dl以上含有する試料を用いた場合に50 は、正確なLDL—コレステロール量を測定することが

できないという問題を有している。

【0004】近年、従来法に於ける上記の如き問題点を解消するために、種々の方法が開発されており、例えば特開平7-280812号公報に開示された方法もその一つである。即ち、LDLを凝集剤又は／及び抗体を使用して凝集させた後に、LDL以外のリポタンパクに含まれるコレステロールを定量反応に関与しない別の反応系に導いて消去（消費）させた後、界面活性剤又は／及び無機塩類を使用して、凝集させたLDLを定量反応ができる程度に溶解させ、LDL-コレステロールを定量反応に付し該溶液の吸光度を測定するという方法がそれである。

【0005】しかしながら、この方法は、測定に3又は4種の試薬が必要であるため、3又は4種の試薬を用いて測定が可能なごく一部の自動分析装置にしか適用できず、通常の臨床検査に於いて用いられている2種の試薬までしか使用できない自動分析装置を用いては測定を実施することができないという問題点がある。また、この方法には、3又は4種の試薬を用いて測定を行うため、測定値の再現性が低下するという問題点もあった。

【0006】更に、煩雑な前処理操作なしでLDL-コレステロールを測定する方法として特開昭58-165800号公報に開示されている方法がある。しかしながら、この方法は、試薬中の例えば界面活性剤やコレステロールエステラーゼの使用濃度が限定されるため試薬の調製が煩雑であり、更に測定時のpHや、測定時間間隔等測定条件を厳密に設定しなくてはならず、しかもHDL中のコレステロールもある程度反応することから、動力学的測定、すなわち、レイト・アッセイでしかLDL-コレステロールの測定を行うことができないため、実用的な測定方法とは言い難い方法であった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記した如き状況に鑑み、本発明が解決しようとする課題は、生体試料中のLDL-コレステロールを、従来法に於いて必要であった、LDLとLDL以外の不要のリポタンパクとを分離するための煩雑な前処理操作なしに直接自動分析装置等を用いて測定することを可能とする方法及びそれに用いられる試薬の提供にある。

【0008】

【発明を解決するための手段】本発明は、両性界面活性剤及び、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の存在下で測定を行うことを特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロールの測定法の発明である。

【0009】また、本発明は、生体試料と、水性媒体を含んでなる第一試液とを混合した後に吸光度(OD₁)を測定し、次いで該混合液と、コレステロールオキシダーゼ及びコレステロールエステラーゼを含んでなる第二試液とを混合して反応させた後に吸光度(OD₂)を測定し、OD₂から、OD₁に補正係数を掛けて得られた値

を差し引いた吸光度(OD₃)を求め、得られたOD₃を、予め既知濃度のコレステロールを含む標準品を用いて上記と同様にして求めた、コレステロール量とOD₃との関係を示す検量線に当てはめることにより生体試料中の低比重リポタンパク中のコレステロールを求める特徴とする、低比重リポタンパク中のコレステロールの測定法であって、両性界面活性剤とカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類が夫々第一試液と第二試液の少なくとも一方に含まれ、また、カップラー、デベロッパー、及びペルオキシダーゼが夫々第一試液と第二試液の少なくとも一方に含まれていることを特徴とする、該測定法の発明である。

【0010】更に、本発明は、両性界面活性剤及び、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類を含んでなる、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用試薬の発明である。

【0011】また、本発明は、カップラー（又はデベロッパー）を含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼと、デベロッパー（又はカップラー）を含んでなる第二試薬とを含んでなるものであって、両性界面活性剤とカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類が夫々第一試薬と第二試薬の少なくとも一方に含まれている、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用キットの発明である。

【0012】更にまた、本発明は、両性界面活性剤と、カップラー（又はデベロッパー）を含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼと、デベロッパー（又はカップラー）を含んでなる第二試薬とを含んでなるものであって、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類が第一試薬と第二試薬の少なくとも一方に含まれている、低比重リポタンパク中のコレステロール測定用キットの発明である。

【0013】即ち、本発明者らは、LDL-コレステロールを、LDL以外の不要なリポタンパクを分離分別するための前処理操作なしに直接自動分析装置で測定し得る方法を見出すべく鋭意研究を重ねた結果、生体試料中のLDL-コレステロールの測定を、両性界面活性剤及び、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の存在下で行えば、LDL以外の不要なリポタンパクを分離分別することなくLDL中のコレステロールを特異的に測定することが可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0014】本発明に於いて用いられる、両性界面活性剤としては、LDL以外のリポタンパクに含有されているコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを抑制する作用を有するものであればよく、特に限定されない。このような両性界面活性剤としてより具体的には、例えばアルキルベタイン誘導体（例えばラウリル

ベタイン、ステアリルベタイン、ラウリルジメチルアンモニウムベタイン、ココナットベタイン、ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン、ラウリン酸アミドプロピルベタイン等)、イミダゾリニウムベタイン誘導体(例えば2-ラウリル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、2-ウンデシル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン等の2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、例えば2-アルキル-N-カルボキシエチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン等)、スルホベタイン誘導体(例えばN-オクチル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸、N-デシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸、N-ヘキサデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸等)のベタイン誘導体、例えばアルキルグリシン、アルキルビス(アミノエチル)グリシン、ジオクチルポリアミノエチルグリシン、N-アルキルポリアミノエチルグリシン、β-アラニン誘導体等のアミノカルボン酸誘導体、例えばビス(2-ウンデシル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリン)クロル酢酸錯体、アルキルイミダゾリン誘導体等のイミダゾリン誘導体、例えばラウリルジメチルアミノキサイド等のアミンオキサイド誘導体等が挙げられる。上記した如き両性界面活性剤のうち、ラウリルベタイン、ヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン、ラウリン酸アミドプロピルベタイン、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン及び2-アルキル-N-カルボキシエチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインが望ましく用いられる。また、これら両性界面活性剤の使用濃度としては、LDL以外のリポタンパクに含有されるコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを抑制し得る濃度であればよく、特に限定されないが、最終の反応液中の濃度が通常0.0001%~10% (W/V)、好ましくは0.001%~1% (W/V)となるように添加される。

尚、これら両性界面活性剤は単独で用いても、或は適宜混合して用いても何れにてもよい。尚、本発明の方法に於いては、非イオン性界面活性剤を共存させると、LDL以外のリポタンパクに含有されているコレステロールがコレステロール測定反応に関与する可能性が高くなるので、非イオン性界面活性剤非共存下で実施することが望ましい。

【0015】本発明に於いて用いられる、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類としては、LDL以外のリポタンパクに含有されているコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを抑制する

作用を有するものであればよく、特に限定されないが、例えばアミノ酸類、アミノエタンスルホン酸誘導体、アミノプロパンスルホン酸誘導体、グリシン誘導体のなかから適宜選択された、前述の如き性質を有するものが挙げられる。このようなアミノ酸類の具体例としては、例えばアラニン、グルタミン、グルタミン酸等が挙げられる。また、アミノエタンスルホン酸誘導体の具体例としては、例えばN-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸(ChES)、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPE)、2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES)等が挙げられ、アミノプロパンスルホン酸誘導体の具体例としては、例えばN-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPS)、N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸(CAPSO)、3-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)、3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(EPPS)、2-ヒドロキシ-3-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]プロパンスルホン酸(HEPPS)、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、2-ヒドロキシ-3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸)(POPSO)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)、2-ヒドロキシ-N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPSO)等が挙げられ、また、グリシン誘導体の具体例としては、例えばN-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン(Tricine)等が挙げられる。上記した如きカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類のうち、2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)、2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)及びN-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)が望ましく用いられる。また、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の使用濃度としては、LDL以外のリポタンパクに含まれているコレステロールがコレステロール測定反応に

与するのを抑制し得る濃度であればよく、特に限定されないが、最終の反応液中の濃度が通常1 mM～2 M、好ましくは10 mM～1 M、より好ましくは100～700 mM、更に好ましくは200～600 mMとなるように添加される。尚、これら化合物は単独で用いても、或は適宜混合して用いても何れにてもよい。

【0016】本発明の測定法は、上記した如き両性界面活性剤と、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類とを併用する以外は、自体公知のコレステロール測定法に準じて実施すれば良く、使用される試薬類もこれら自体公知の方法に準じて適宜選択すればよい。即ち、血清、血漿等の生体試料中のLDL-コレステロールを、両性界面活性剤と、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の存在下、自体公知のコレステロール測定法に準じて測定することにより、生体試料中のLDL-コレステロールを特異的に測定することができる。

【0017】これら自体公知のコレステロール測定法としては、生体試料中のコレステロールを測定し得る自体公知のコレステロール測定法は全て挙げられるが、酵素反応を利用する、例えば試料中のコレステロールエステルをコレステロールエステラーゼ (CHE) によって遊離コレステロールと脂肪酸に分解し、初めから存在する遊離コレステロールと共に、コレステロールオキシダーゼ (COD) によって酸化して、コレステ-4-エン-3-オンと過酸化水素にし、ペルオキシダーゼ (POD) 存在下、生成した過酸化水素で被酸化性呈色試薬を酸化発色させて、生じた酸化色素を比色定量する酸化呈色法、例えば試料中のコレステロールエステルをコレステロールエステラーゼ (CHE) によって遊離コレステロールと脂肪酸に分解し、初めから存在する遊離コレステロールと共にコレステロール脱水素酵素 (CHD) の存在下NADと反応させて、生成するNADHを340 nmで測定する紫外外部測定法等が好ましく挙げられる。

【0018】本発明の測定法に用いられるコレステロールオキシダーゼは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、ノカルディア属、ショードモナス属等の微生物に由来するもの、牛臍臓等動物臓器に由来するもの等は全て使用可能である。コレステロールオキシダーゼの使用量としては、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.02～10 u/ml、好ましくは0.1～2 u/mlの範囲から適宜選択される。

【0019】本発明の測定法に用いられるコレステロールエステラーゼは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、キャンディダ属、ショードモナス属等の微生物に由来するもの、牛臍臓等動物臓器に由来するもの等は全て使用可能である。コレステロールエステラーゼの使用量としては、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.02～10

u/ml、好ましくは0.1～2 u/mlの範囲から適宜選択される。

【0020】本発明の測定法に用いられるペルオキシダーゼは、その由来は特に限定されず、通常この分野で使用されているもの、例えば、西洋ワサビ、大根等の植物に由来するもの、カビ、酵母等の微生物に由来するもの、動物の白血球、甲状腺等に由来するもの等は全て使用可能である。ペルオキシダーゼの使用量としては、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01～50 u/ml、好ましくは0.1～5 u/mlの範囲から適宜選択される。

【0021】本発明の測定法に用いられる被酸化性呈色試薬としては、PODの存在下、過酸化水素と反応して呈色するものであれば何れにても良いが、4-アミノアンチピリン (4-AA) 等のカップラー及び、該カップラーと酸化縮合して色素を生ずるデベロッパーとの組合せ、即ち、例えば4-AAとフェノール系化合物、ナフトール系化合物若しくはアニリン系化合物の組合せ、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンとアニリン系化合物の組合せ等や、例えば2, 2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) 、トリフェニルメタン系ロイコ色素、ジフェニルアミン誘導体、ベンジジン誘導体、トリアリルイミダゾール誘導体、ロイコメチレンブルー誘導体、o-フェニレンジアミン誘導体等の酸化によってそれ自体が発色する発色剤等が挙げられる。デベロッパーとしてのフェノール系化合物の具体例としては、例えばフェノール、p-クロロフェノール、2, 4-ジクロロフェノール等が挙げられ、ナフトール系化合物の具体例としては、例えば1-ナフトール、1-ナフトール-2-スルホン酸、1-ナフトール-2-カルボン酸等が挙げられ、また、アニリン系化合物の具体例としては、例えばN, N-ジエチルアニリン、N-エチル-N-(β-ヒドロキシエチル)-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン (DAOS) 、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン (FDAOS) 、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン (HDAOS) 、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン (TOOS) 、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニル-エチレンジアミン (EMSE) 等が挙げられる。カップラーとデベロッパーとの組合せを用いる場合、カップラーの使用量としては、用いるカップラーの種類や組み合わせるデベロッパーの種類等により異なるため一概には言えないが、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01～100 mM、好ましくは0.1～10 mMの範囲から適宜選択され、カップラーとして4-AAを使用する場合の使用量としては、コレステロール測定時の反

応液中の濃度として、通常0.01～50mM、好ましくは0.1～5mMの範囲から適宜選択される。また、デベロッパーの使用量としては、用いるデベロッパーの種類や組み合わせるカップラーの種類等により異なるため一概には言えないが、コレステロール測定時の反応液中の濃度として、通常0.01～50mM、好ましくは0.1～5mMの範囲から適宜選択される。トリフェニルメタン系ロイコ色素の具体例としては、例えばロイコマラカイトグリーン、ビス(p-ジエチルアミノフェニル) -2-スルホフェニルメタン、ビス(p-ジエチルアミノフェニル) -3, 4-ジスルホプロポキシフェニルメタン・ジナトリウム塩等が挙げられ、ジフェニルアミン誘導体の具体例としては、例えばビス[4-ジ(2-ブロキシエチル)アミノ-2-メチルフェニル]アミン、N, N-ビス(4-ジエチルアミノ-2-メチルフェニル)-N' -p-トルエンスルホニル尿素等が挙げられ、また、ロイコメチレンブルー誘導体の具体例としては、例えば10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン・ナトリウム塩、10-[3-(メトキシカルボニルアミノメチル)フェニルメチルアミノカルボニル]-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン等が挙げられる。更に、ベンジジン誘導体の具体例としては、例えばベンジジン、o-トリジン、o-ジアニシジン、3, 3'-ジアミノベンジジン、3, 3', 5, 5'-テトラアミノベンジジン等が挙げられ、トリアリルイミダゾール誘導体の具体例としては、例えば2-(4-カルボキシフェニル)-3-N-メチルカルバモイル-4, 5-ビス(4-ジエチルアミノフェニル)イミダゾール、2-(3-メトキシ-4-ジエチルアミノフェニル)-3-N-メチルカルバモイル-4, 5-ビス(2-メチル-4-ジエチルアミノフェニル)イミダゾール等が挙げられる。これら発色剤の使用量としては、通常この分野で用いられる濃度範囲から適宜選択される。

【0022】本発明のLDL-コレステロール測定用試薬は、例えば血清や血漿等の生体由来試料中のLDL-コレステロールを測定するために使用されるもので、両性界面活性剤と、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類とを使用する以外は、上記した如き自体公知のコレステロール測定法に使用されるコレステロール測定用試薬、例えば酸化呈色法に於いて使用されるCOD、CHE、POD、被酸化性呈色試薬、緩衝剤等の試薬類、例えば紫外外部測定法に於いて使用されるCHE、CHD、NAD、緩衝剤等の試薬類を、この分野で使用される濃度範囲で含有するように調製されたものであり、構成要件の好ましい態様や使用濃度等は、上で述べた通りである。

【0023】本発明のLDL-コレステロール測定用試薬は、1液法用として調製されたものでも2液法用として調製されたものでも又それ以上に分けたものでも何れ

10 いてもよく、特に限定されない。尚、2液以上の試薬に分けた場合には、両性界面活性剤とカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の夫々が少なくとも何れかの試薬に含まれていれば良い。また、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ等の酵素類も何れかの試薬に含まれていればよい。また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中には、例えればアニオン性化合物(例えばデキストラント硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、リンタングステン酸等のポリアニオン等)等のイオン性化合物が含まれていても良い。これらは単独または混合して使用することができる。更に、Mg²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺等のカチオン(或いはこれらカチオンを生じさせ得る金属塩)と組み合わせて使用してもよい。これらイオン性化合物の使用濃度としては、特に限定されないが、反応液中の濃度が、通常0.01～10% (W/V) の範囲で使用される。また、本発明のLDL-コレステロール測定用試薬中にはLDL以外のリポタンパク中のコレステロールがコレステロール測定反応に関与することを防止するために、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の1種または2種以上を共存させてもよい。このような目的で使用可能な抗体としては、例えば抗アポリポタンパクA抗体、抗アポリポタンパクC抗体、抗アポリポタンパクE抗体、抗αリポタンパク抗体等が挙げられる。これら抗体の使用濃度としては、LDL以外のリポタンパク中に含まれるコレステロールがコレステロール測定反応に関与するのを防止し得る濃度以上であればよく、特に限定されないが、最終の反応液中の濃度が通常0.001～10mgAb/ml、好ましくは0.01～1mgAb/mlとなるように反応液中に添加される。

20 【0024】本発明のLDL-コレステロールの測定法は、1液法によても2液法によても又それ以上の方によても実施することができる。2液法の場合には、両性界面活性剤とカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の夫々が少なくとも第1試液と第2試液の何れかに含まれていれば良く、また、カップラー、デベロッパー及びペルオキシダーゼの夫々が少なくとも第1試液と第2試液の何れかに含まれていれば良い。尚、第1試液及び第2試液に於いて、夫々の試液に含まれる成分は、例えば水、緩衝液等の水性媒体、好ましくは緩衝液に溶解される。また、第1試液は、他の成分を含まず、水性媒体のみからなるものであっても良い。また、第1試液の水性媒体として水を用いる場合には、第2試液の水性媒体としては緩衝液を用いるのが望ましい。更に、水性媒体として緩衝液を用いる場合には、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類を含まない試液に於ける水性媒体を緩衝液とすることが望ましい。

30 【0025】本発明の測定法に用いられる緩衝剤としては、pH5～11の範囲で緩衝作用を有し、コレステロール測定反応を阻害しないものであれば特に限定されず、通

常この分野で使用されているものは全て使用可能である。このような緩衝剤としては、例えばトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、グッドの緩衝剤、リン酸、ホウ酸等が挙げられ、緩衝剤の使用濃度としては特に限定されないが、通常1mM~2M、好ましくは10mM~1Mの範囲から適宜選択され、また、pHは、通常5~11、好ましくは6~8、より好ましくは7付近の範囲から適宜選択される。

【0026】本発明の測定法の好ましい実施態様としては、例えば以下の如くである。即ち、例えば血清、血漿等の生体試料と、例えば水性媒体、カッラー、両性界面活性剤、及びカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類、要すればイオン性化合物、カチオン、抗体等を含有する第1試液とを混合し、2~40°Cで1~30分間反応させた後に吸光度(OD₁)を測定する。次いで、該反応液と、例えばコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、デベロッパー及び、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類、を含有する第2液とを混合し、2~40°Cで1~60分反応させた後に吸光度(OD₂)を測定する。上記のOD₂からOD₁に由来する値(例えばOD₁に補正係数を掛けて求めた値)を差し引いた吸光度(OD₃)を求め、得られたOD₃を、例えば予めLDL-コレステロール濃度既知の標準液等の標準品を試料として上記と同様にして求めた、LDL-コレステロール濃度とOD₃との関係を示す検量線に当てはめることにより、生体試料中のLDL-コレステロールの値を求める。

【0027】また、本発明のLDL-コレステロールの測定法は、1液法により実施しても良く、この場合は、例えば以下の如く行えばよい。即ち、例えば血清、血漿等の生体試料と、例えばコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、被酸化性呈色試薬(又は、カッラー及びデベロッパー)、両性界面活性剤、及びカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類、要すればイオン性化合物、カチオン、抗体等を含有する試液とを混合し、2~40°Cで1~30分間反応させた後に吸光度(OD₁)を測定する。また、生体試料の代わりに生理食塩水等を使用する以外は上記と同じ試薬を用い同様の操作を行って盲検値(OD_{BL})を求める。次いで、OD₁からOD_{BL}差し引いた吸光度(OD₂)を求め、これを、例えば予めLDL-コレステロール濃度既知の標準液等の標準品を試料として上記と同様にして求めた、LDL-コレステロール濃度とOD₂との関係を示す検量線に当てはめることにより、生体試料中のLDL-コレステロールの値が求められる。

【0028】本発明のLDL-コレステロール測定用キットは、例えば血清や血漿等の生体由来試料中のLDL-コレステロールを測定するために使用されるもので、

カッラー(又はデベロッパー)を含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼと、デベロッパー(又はカッラー)を含んでなる第二試薬とを含んでなるものであって、両性界面活性剤とカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類が夫々第一試薬と第二試薬の少なくとも一方に含まれているものであり、夫々の構成要素の好ましい様態、具体例については上で述べた通りである。また、当該キットには、必要に応じて、LDL-コレステロール標準品等が組み合わされていても良いことは言うまでもない。

【0029】また、両性界面活性剤はコレステロールエステラーゼを失活させる可能性もあるので、これらは別々の試薬に含まれている方が好ましく、従って、本発明のLDL-コレステロール測定用キットは、保存安定性等の点から、例えば以下の如き組合せからなるのがより好ましい。即ち、両性界面活性剤と、カッラー(又はデベロッパー)を含んでなる第一試薬と、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼと、デベロッパー(又はカッラー)を含んでなる第二試薬とを含んでなるものであって、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類が第一試薬と第二試薬の少なくとも一方に含まれているものが好ましい。尚、夫々の構成要素の好ましい様態、具体例については上で述べた通りであり、また、当該キットには、必要に応じて、LDL-コレステロール標準品等が組み合わされていても良い。

【0030】本発明のLDL-コレステロール測定法及び測定用試薬並びに測定用キットは、両性界面活性剤及び、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の存在下で、コレステロールの測定を行わせるために、HDLのみならずVLDL、カイロミクロン等のLDL以外のリポタンパク中のコレステロールとは実質的に反応せず、LDL-コレステロールのみと特異的に反応するので、従来法では困難であったエンドポイント・アッセイでのLDL-コレステロール測定を可能ならしめるものである。また、標準品についても、必ずしもコレステロールの純品を用いて調製された標準液を用いる必要はなく、例えばヒトや動物等の血清を用いて調製された標準血清を標準品として使用することができる。

【0031】以下に、実施例及び参考例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0032】

【実施例】

実施例1

日立7170形自動分析装置〔(株)日立製作所製〕を使用して、本発明の測定法により、超遠心法で分画したリポタンパクの反応性を比較した。(試料)自体公知の超遠心法で血清より分画して得たHDL画分(64.9mg/

dl)、LDL画分 (148.2mg/dl)、VLDL画分 (76.3mg/dl) 又はCM画分 (28.4mg/dl) を試料とした。

(試薬)

・試薬1

R-1 ; 4-アミノアンチピリン 1mMを含有する200mM ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPERAZINE-1,4-BIS(2-ETHANSULFONIC ACID)) (PIPE S) 緩衝液 (pH7.0) をR-1とした。

R-2 ; コレステロールオキシダーゼ (CHO" Amano" VW、天野製薬(株)製。) 2U/ml、コレステロールエステラーゼ (製造番号: T-18、旭化成工業(株)製) 2U/ml、パーオキシダーゼ (製造番号: PEO-302、東洋紡(株)製。) 1U/ml、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン Na塩 (DAO S) 1mM及びアンヒトール24B [花王(株)商品名。ココナットベタイン。] 0.08% (W/V) を含有する200mM ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPERAZINE-1,4-BIS(2-ETHANSULFONIC ACID)) (PIPE S) 緩衝液 (pH7.0) をR-2とした。

・試薬2

R-1 ; 4-アミノアンチピリン 1mMを含有する200mM ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPERAZINE-1,4-BIS(2-ETHANSULFONIC ACID)) (PIPE S) 緩衝液 (pH7.0) をR-1とした。

R-2 ; コレステロールオキシダーゼ (CHO" Amano" VW、天野製薬(株)製。) 2U/ml、コレステロールエステラーゼ (製造番号: T-18、旭化成工業(株)製) 2U/ml、パーオキシダーゼ (製造番号: PEO-302、東洋紡(株)製。) 1U/ml、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン Na塩 (DAO S) 1mM及びアンヒトール24B [花王(株)商品名。ココナットベタイン。] 0.08% (W/V) を含有する200mM ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPERAZINE-1,4-BIS(2-ETHANSULFONIC ACID)) (PIPE S) 緩衝液 (pH7.0) をR-2とした。

・試薬3

R-1 ; 4-アミノアンチピリン 1mMを含有する200mM N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)緩衝液 (pH7.0) をR-1とした。

R-2 ; コレステロールオキシダーゼ (CHO" Amano" VW、天野製薬(株)製。) 2U/ml、コレステロールエステラーゼ (製造番号: T-18、旭化成工業(株)製) 2U/ml、パーオキシダーゼ (製造番号: PEO-302、東洋紡(株)製。) 1U/ml、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン Na塩 (DAO S) 1mM及びソフトゾリンL P B-R [川研ファインケミカル(株)商品名。ラウリン酸アミドプロピルベタイン] 0.1%を含有する200mM N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)緩衝液 (pH7.0) をR-2とした。

(測定条件)

測定パラメータを以下のように設定して測定を行った。
測定方法; 2ポイント エンド[16]-[34]

試料量 ; 3 μ l

R-1 ; 270 μ l

R-2 ; 90 μ l

測定波長 ; 700 / 600 nm

測定温度 ; 37°C

(結果) 図1に試薬1を使用して得られた測定結果を、図2に試薬2を使用して得られた測定結果を、図3に試薬3を使用して得られた測定結果を表します。尚、図1～3に於いて、□はHDLを含有する試料について得られた結果を、◆はLDLを含有する試料について得られた結果を、◇はVLDLを含有する試料について得られた結果を、×はCMを含有する試料について得られた結果を、また、●はリポタンパクを含有しない試料について得られた結果を表します。図1の測定結果から明らかに、両性界面活性剤であるアンヒトール24Bは含有しているが、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類を含有していない試薬1は、リポタンパク中のコレステロールと殆ど反応しないことが判る。

これに対して、図2の測定結果から、アンヒトール24Bのみならず、スルホン酸基を有する脂肪族アミン類であるピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPERAZINE-1,4-BIS(2-ETHANSULFONIC ACID)) (PIPE S) 共存下でリポタンパク中のコレステロールの測定を行うと、LDL中のコレステロールを特異的に測定し得るようになることが判る。また、同様に図3の測定結果から、両性界面活性剤であるソフトゾリンL P B-Rと、カルボキシル基を有する脂肪族アミン類であるN-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA)の共存下でリポタンパク中のコレステロールの測定を行った場合でも、LDL中のコレステロールを特異的に測定し得るようになることが判る。以上のことから、両性界面活性剤と、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類との存在下でリポタンパク中のコレステロールの測定を行うと、LDL中のコレステロールを特異的に測定し得ることが判る。

【0033】実施例2

(試料) 実施例1と同じ。

(試薬)

R-1 ; 4-アミノアンチピリン 1mMを含有する200mM 2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) 緩衝液 (pH7.0) をR-1とした。

R-2 ; コレステロールオキシダーゼ (CHO" Amano" VW、天野製薬(株)製。) 2U/ml、コレステロールエステラーゼ (製造番号: T-18、旭化成工業(株)製) 2U/ml、パーオキシダーゼ (製造番号: PEO-302、東洋紡(株)製。) 1U/ml、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン Na塩 (DAO S) 1mM及び下記表1に挙げた所定の界面活性剤を所定濃度含有する200mM 2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES) 緩衝液 (pH7.0) をR-2とした。

【0034】

【表1】

表1

界 面 活 性 劑	R-2中濃度
非イオン性 界面活性剤	エマルゲン709【花王(株)商品名。】 (ギリオキシエレン高級アルコール)
	エマルゲン120【花王(株)商品名。】 (ギリオキシエレンラウリル)
	n-オクチル-β-ドーグルコシド 【(株) 同仁化学研究所製。】
陰イオン性 界面活性剤	エマールNC-35【花王(株)商品名。】 (ギリオキシエレンアルキルフェニルエーテル硫酸ナトリウム)
	コール酸 【和光純業工業(株)製。】
陽イオン性 界面活性剤	n-ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド 【和光純業工業(株)製。】
	ヘキサデシルピリジニウムクロリド 【和光純業工業(株)製。】
両性界面活性剤	ソフタゾリンCPB【川研ファインカル(株)商品名。】 (ヤシ油脂肪酸アドグリセロベタイン。ベタイン誘導体)
	アミポールAD【日華化学(株)商品名。】 (アミノカルボン酸誘導体)
	レボン101-H【三洋化成工業(株)商品名。】 (イミダゾリン誘導体)
	アンヒトール20N【花王(株)商品名。】 (ラウリルジメチルアンモニウムクロリド誘導体)

【0035】(測定条件) 実施例1と同じ。

(結果) 図4に界面活性剤としてエマルゲン709を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図5に界面活性剤としてエマルゲン120を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図6に界面活性剤としてn-オクチル-β-ドーグルコシドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図7に界面活性剤としてエマールNC-35を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図8に界面活性剤としてコール酸を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図9に界面活性剤としてn-ドデシルトリメチルアンモニウムクロリドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図10に界面活性剤としてヘキサデシルピリジニウムクロリドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図11に界面活性剤としてソフタゾリンCPBを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図12に界面活性剤としてアミポールADを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図13に界面活性剤としてレボン101-Hを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図14に界面活性剤としてアンヒトール20Nを含有するR-2を使用して得られた測定結果を夫々示す。尚、図4~14に於いて、□はHDLを含有する試料について得られた結果を、◆はLDLを含有する試料について得られた結果を、◇はVLDLを含有する試料について得られた結果を、△はCMを含有する試料について得られた結果を、×はリポタンパクを含有しない試料について得られた結果を夫々示す。

30 0035】(測定条件) 実施例1と同じ。

30 (結果) 図4に界面活性剤としてエマルゲン709を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図5に界面活性剤としてエマルゲン120を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図6に界面活性剤としてn-オクチル-β-ドーグルコシドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図7に界面活性剤としてエマールNC-35を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図8に界面活性剤としてコール酸を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図9に界面活性剤としてn-ドデシルトリメチルアンモニウムクロリドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図10に界面活性剤としてヘキサデシルピリジニウムクロリドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図11に界面活性剤としてソフタゾリンCPBを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図12に界面活性剤としてアミポールADを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図13に界面活性剤としてレボン101-Hを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図14に界面活性剤としてアンヒトール20Nを含有するR-2を使用して得られた測定結果を夫々示す。尚、図4~14に於いて、□はHDLを含有する試料について得られた結果を、◆はLDLを含有する試料について得られた結果を、◇はVLDLを含有する試料について得られた結果を、△はCMを含有する試料について得られた結果を、×はリポタンパクを含有しない試料について得られた結果を夫々示す。

30 0035】(測定条件) 実施例1と同じ。

30 (結果) 図4に界面活性剤としてエマルゲン709を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図5に界面活性剤としてエマルゲン120を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図6に界面活性剤としてn-オクチル-β-ドーグルコシドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図7に界面活性剤としてエマールNC-35を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図8に界面活性剤としてコール酸を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図9に界面活性剤としてn-ドデシルトリメチルアンモニウムクロリドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図10に界面活性剤としてヘキサデシルピリジニウムクロリドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図11に界面活性剤としてソフタゾリンCPBを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図12に界面活性剤としてアミポールADを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図13に界面活性剤としてレボン101-Hを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図14に界面活性剤としてアンヒトール20Nを含有するR-2を使用して得られた測定結果を夫々示す。尚、図4~14に於いて、□はHDLを含有する試料について得られた結果を、◆はLDLを含有する試料について得られた結果を、◇はVLDLを含有する試料について得られた結果を、△はCMを含有する試料について得られた結果を、×はリポタンパクを含有しない試料について得られた結果を夫々示す。

30 0035】(測定条件) 実施例1と同じ。

30 (結果) 図4に界面活性剤としてエマルゲン709を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図5に界面活性剤としてエマルゲン120を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図6に界面活性剤としてn-オクチル-β-ドーグルコシドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図7に界面活性剤としてエマールNC-35を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図8に界面活性剤としてコール酸を含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図9に界面活性剤としてn-ドデシルトリメチルアンモニウムクロリドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図10に界面活性剤としてヘキサデシルピリジニウムクロリドを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図11に界面活性剤としてソフタゾリンCPBを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図12に界面活性剤としてアミポールADを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図13に界面活性剤としてレボン101-Hを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図14に界面活性剤としてアンヒトール20Nを含有するR-2を使用して得られた測定結果を夫々示す。尚、図4~14に於いて、□はHDLを含有する試料について得られた結果を、◆はLDLを含有する試料について得られた結果を、◇はVLDLを含有する試料について得られた結果を、△はCMを含有する試料について得られた結果を、×はリポタンパクを含有しない試料について得られた結果を夫々示す。

【0036】実施例3

40 日立7170形自動分析装置【(株)日立製作所製】を使用して、本発明の測定法により、超遠心法で分画したリポタンパクの反応性を比較した。

(試料) 自体公知の超遠心法で血清より分画して得たHDL画分(63.1mg/dl)、LDL画分(138.1mg/dl)、VLDL画分(77.3mg/dl)又はCM画分(35.0mg/dl)を試料とした。

(試薬)

R-1; グルタミン酸 400mM及びN-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(HDAO-S) 0.6mMを含有する100mM ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン(Bis-Tri

s) 緩衝液 (pH7.0) を R-1 とした。

R-2 ; コレステロールオキシダーゼ (CHO "Amano" VW、天野製薬(株)製。) 2U/ml、コレステロールエステラーゼ (製造番号: T-18、旭化成工業(株)製) 1.6U/ml、ペーオキシダーゼ (製造番号: PEO-302、東洋紡(株)製。) 6U/ml、4-アミノアンチピリン 3mM及びソフタゾリン CL 0.1% (W/V) [川研ファインケミカル(株)商品名。2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインベタイン] 含有する100mM ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン (Bis-Tris) 緩衝液 (pH7.0) を R-2 とした。

【0037】 (測定条件) 実施例1と同じ。

(結果) 図15に得られた測定結果を示す。尚、図15に於いて、□はHDLを含有する試料について得られた結果を、◆はLDLを含有する試料について得られた結果を、◇はVLDLを含有する試料について得られた結果を、○はCMを含有する試料について得られた結果を、また、●はリポタンパクを含有しない試料について得られた結果を夫々示す。図15の測定結果から明らかな如く、両性界面活性剤としてソフタゾリンCL及びアミノ酸としてグルタミン酸の存在下でリポタンパク中のコレステロールの測定を行えば、LDL中のコレステロールを特異的に測定し得ることが判る。

【0038】 実施例4

(試料) 実施例3と同じ。

(試薬)

R-1 ; N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン (HDAOS) 0.6mMを含有する400mM ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPES) 緩衝液 (pH7.0) を R-1 とした。

R-2 ; コレステロールオキシダーゼ (CHO "Amano" VW、天野製薬(株)製。) 2U/ml、コレステロールエステラーゼ (製造番号: T-18、旭化成工業(株)製) 1.6U/ml、ペーオキシダーゼ (製造番号: PEO-302、東洋紡(株)製。) 6U/ml、4-アミノアンチピリン 3mM及び下記表2に挙げた所定の界面活性剤を0.08% (W/V) 含有する400mM ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPES) 緩衝液 (pH7.0) を R-2 とした。

【0039】

【表2】

表2

両性界面活性剤	
ソフタゾリンCL [川研ファインケミカル(株)商品名。] (2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン)	
ソフタゾリンNS [川研ファインケミカル(株)商品名。] (ナトリウム-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン)	
エナジコールC-40H [ライオン] (2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン)	

* 【0040】 (測定条件) 実施例1と同じ。

(結果) 図16に界面活性剤としてソフタゾリンCLを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図17に界面活性剤としてソフタゾリンNSを含有するR-2を使用して得られた測定結果を、図18に界面活性剤としてエナジコールC-40Hを使用して得られた測定結果を夫々示す。尚、図16～18に於いて、□はHDLを含有する試料について得られた結果を、◆はLDLを含有する試料について得られた結果を、◇はVLDLを含有する試料について得られた結果を、△はCMを含有する試料について得られた結果を、また、●はリポタンパクを含有しない試料について得られた結果を夫々示す。図16～18の測定結果から明らかな如く、両性界面活性剤及びカルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類の存在下でリポタンパク中のコレステロールの測定を行えば、LDL中のコレステロールを特異的に測定し得ることが判る。

【0041】 実施例5

血清、血漿等生体試料中のLDL-コレステロールの測定を実施するために使用される、測定用キットの代表的な例としては、以下のようなものが挙げられる。

(1) 第一試薬 (pH6.5～7.5) : カップラー(又はデベロッパー)、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類。

(2) 第二試薬 (pH6.5～7.5) : コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、デベロッパー(又はカップラー)、両性界面活性剤、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類。

【0042】 実施例6

血清、血漿等生体試料中のLDL-コレステロールの測定を実施するために使用される、測定用キットの代表的な例としては、以下のようなものが挙げられる。

(1) 第一試薬 (pH6.5～7.5) : 両性界面活性剤、カップラー(又はデベロッパー)、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類。

(2) 第二試薬 (pH6.5～7.5) : コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、ペルオキシダーゼ、デベロッパー(又はカップラー)、カルボキシル基又はスルホン酸基を有する脂肪族アミン類。

40

【0043】

【発明の効果】 以上述べた如く、本発明は試料中のLDL-コレステロールを特異的に且つ精度良く測定し得る方法並びにそれに用いられる試薬を提供するものであり、本発明を利用することにより、従来の方法では不可能であったLDL-コレステロールを直接、しかも汎用の自動分析装置を用いて測定し得るという効果を奏するものであるので、斯業に貢献するところ大なる発明である。

50

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図2】実施例1で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図3】実施例1で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図4】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図5】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図6】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図7】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図8】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図9】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図10】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図11】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図12】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図13】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図14】実施例2で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図15】実施例3で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

* 【図16】実施例4で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図17】実施例4で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【図18】実施例4で得られた、各種リポタンパクを含む各種試料についての反応曲線を示す。

【符号の説明】

図1～14に於いて、□は高比重リポタンパク (HDL)

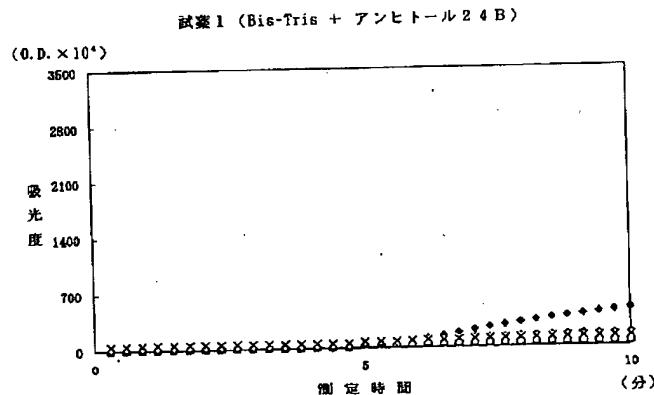
10 ◆は低比重リポタンパク (LDL) を含有する試料について得られた結果を、◇は超低比重リポタンパク (VLDL) を含有する試料について得られた結果を、×はカイロミクロン (CM) を含有する試料について得られた結果を、また、●はリポタンパクを含有しない試料について得られた結果を夫々示す。図15に於いて、□は高比重リポタンパク (HDL) を含有する試料について得られた結果を、◆は低比重リポタンパク (LDL) を含有する試料について得られた結果を、◇は超低比重リポタンパク (VLDL) を含有する試料について得られた結果を、

20 ○はカイロミクロン (CM) を含有する試料について得られた結果を、また、●はリポタンパクを含有しない試料について得られた結果を夫々示す。図16～18に於いて、□は高比重リポタンパク (HDL) を含有する試料について得られた結果を、◆は低比重リポタンパク (LDL) を含有する試料について得られた結果を、◇は超低比重リポタンパク (VLDL) を含有する試料について得られた結果を、△はカイロミクロン (CM) を含有する試料について得られた結果を、また、●はリポタンパクを含有しない試料について得られた結果を夫々示す。

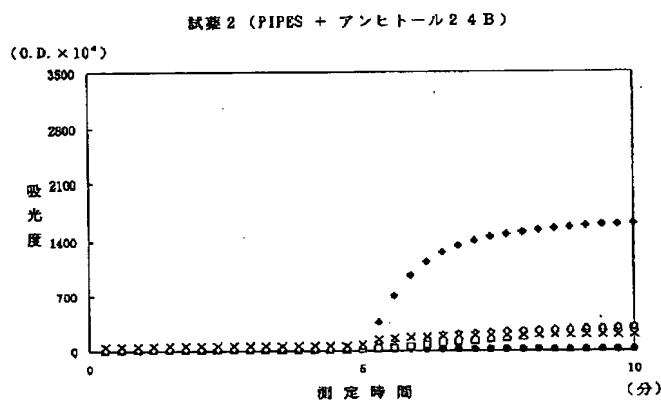
* 30

示す。

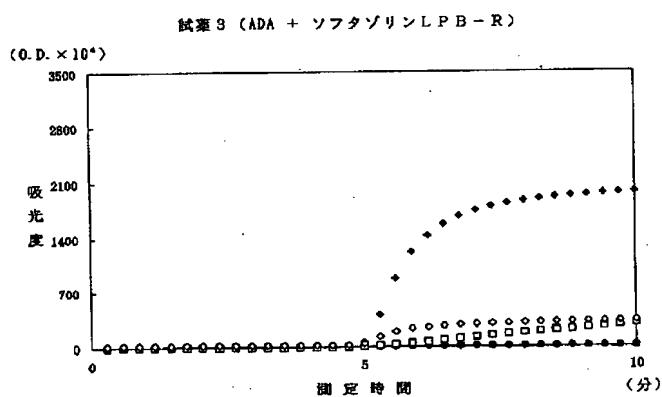
【図1】



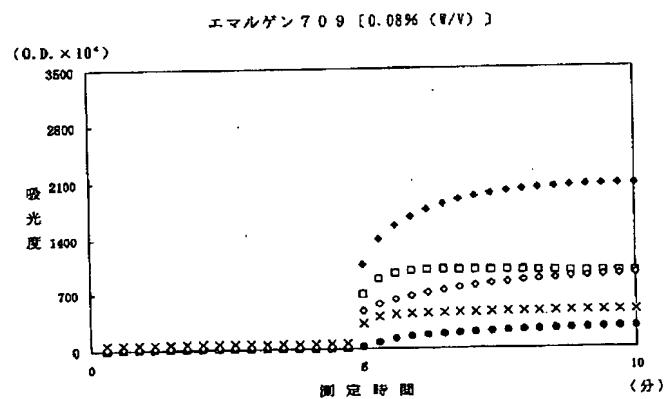
【図2】



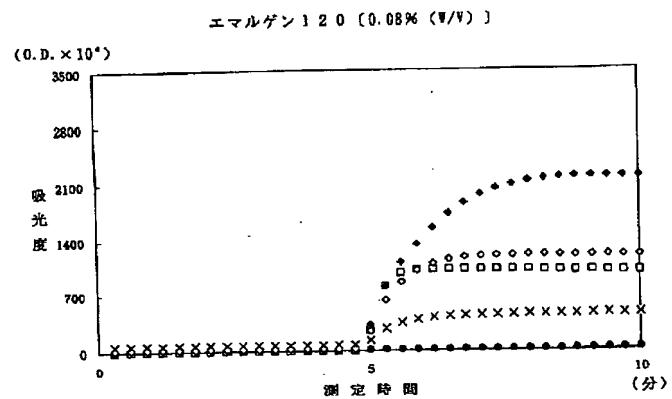
【図3】



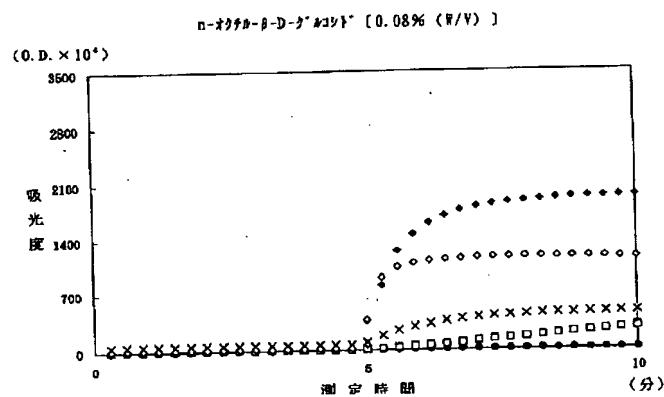
【図4】



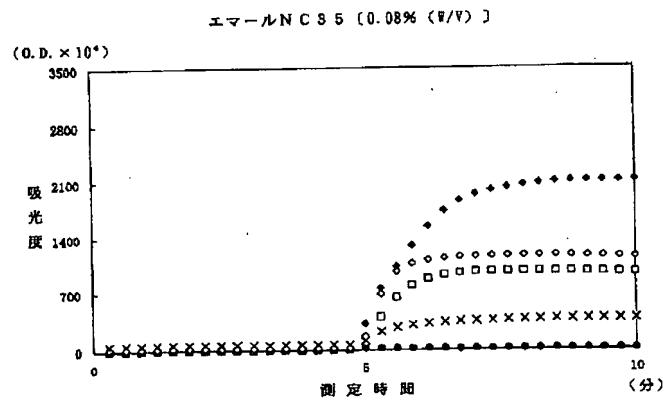
【図5】



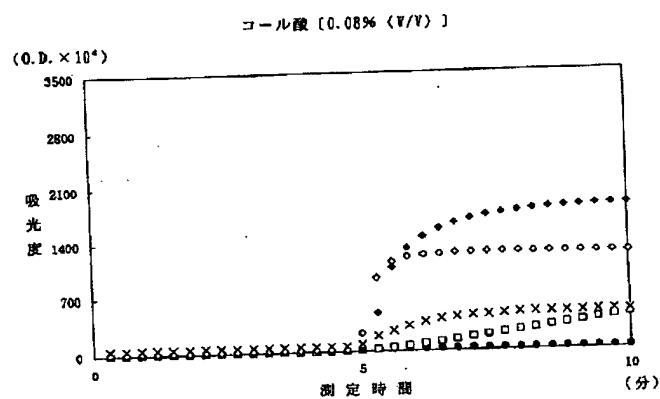
【図6】



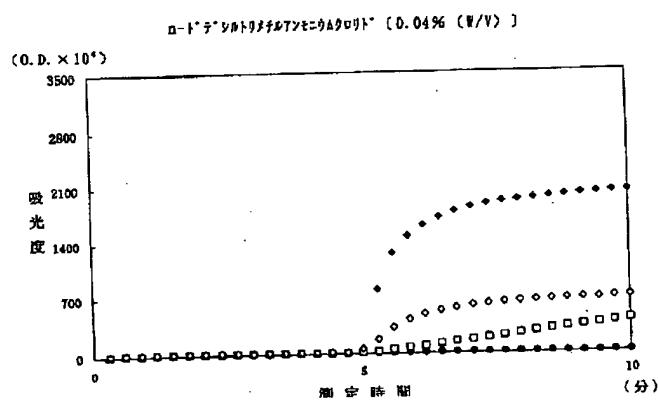
【図7】



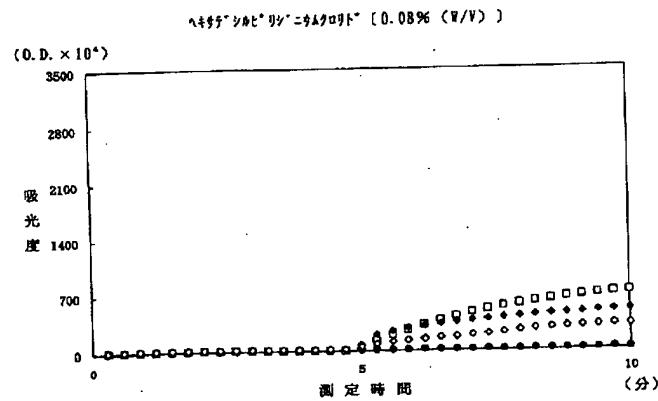
【図8】



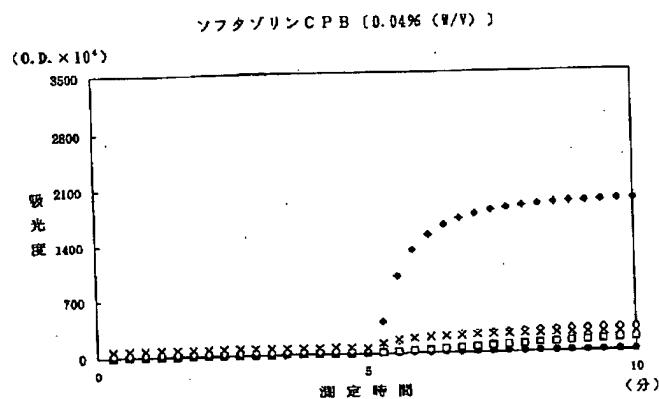
【図9】



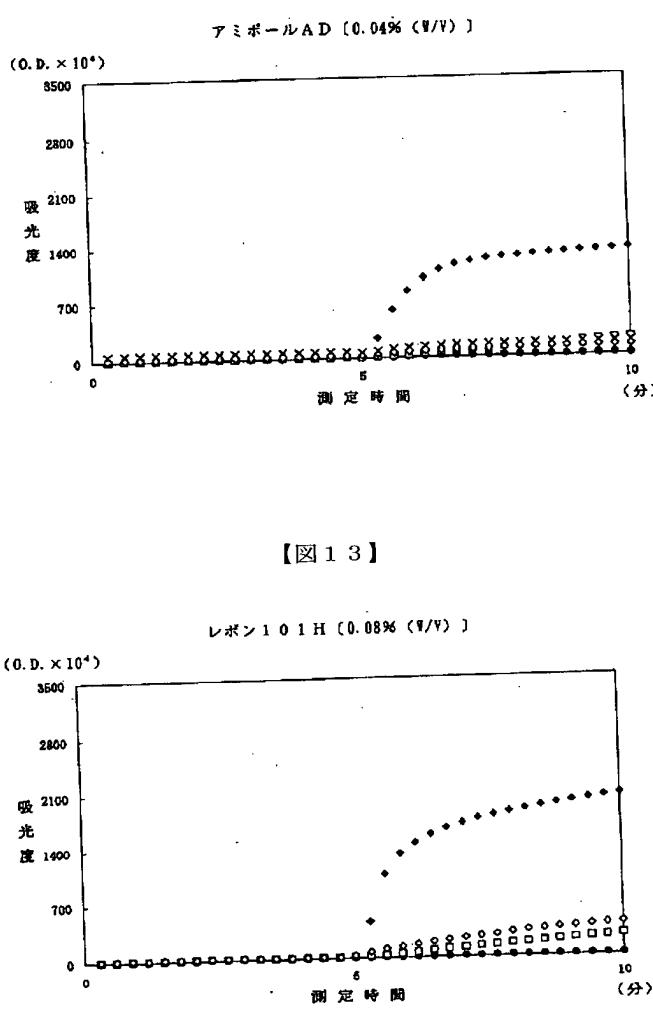
【図10】



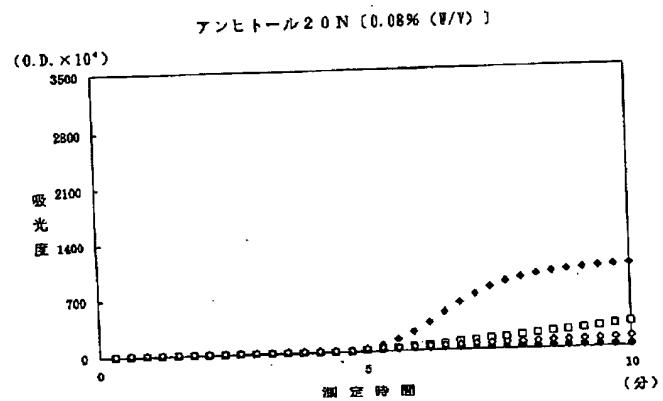
【図11】



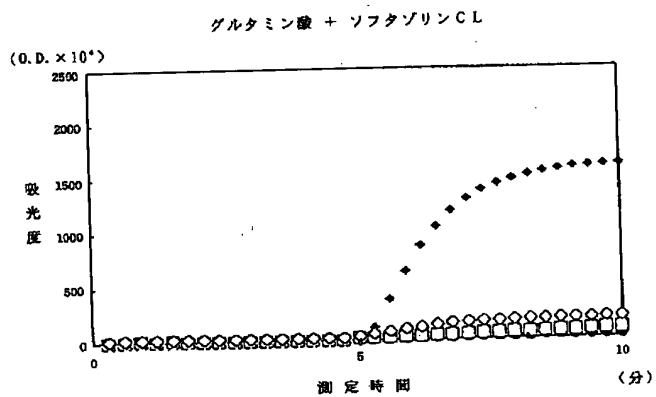
【図12】



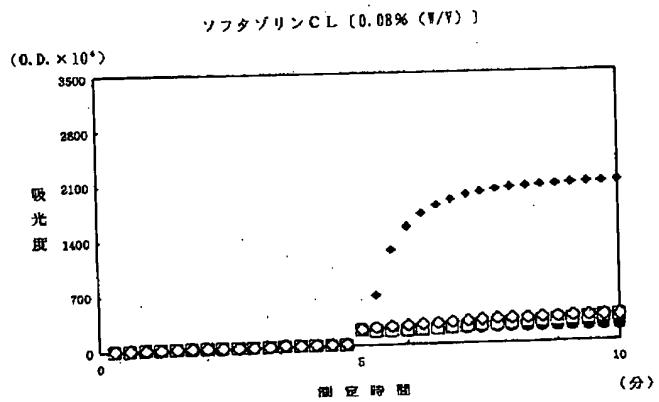
【図14】



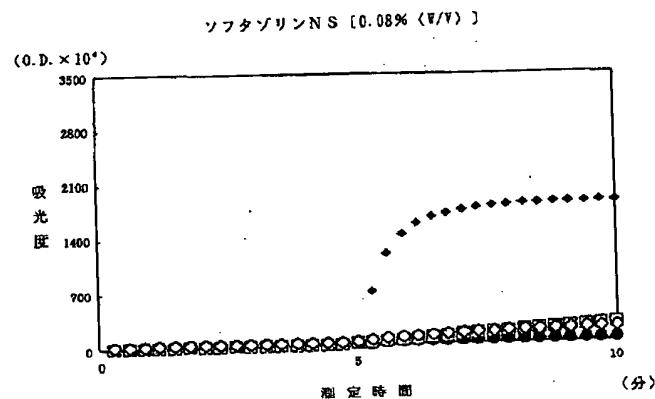
【図15】



【図16】



【図17】



【図18】

